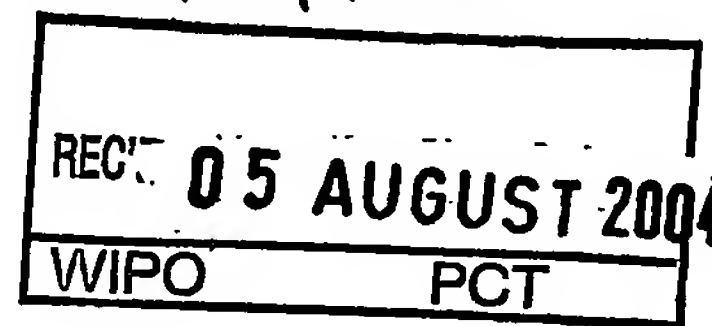


**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

103 37 028.5

Anmeldetag:

12. August 2003

Anmelder/Inhaber:

Degussa AG, 40474 Düsseldorf/DE

Bezeichnung:

Verfahren zur Herstellung von L-Threonin

IPC:

C 12 P 13/08

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 08. Juli 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Schäfer

Verfahren zur Herstellung von L-Threonin

Gegenstand der Erfindung ist ein verbessertes Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Threonin unter Verwendung von Bakterien der Familie Enterobacteriaceae.

5 Stand der Technik

L-Threonin findet in der Humanmedizin, in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, dass L-Threonin durch Fermentation von
10 Stämmen der Familie der Enterobacteriaceae, insbesondere Escherichia coli und Serratia marcescens, hergestellt werden kann. Wegen der großen Bedeutung dieser Aminosäure wird ständig an der Verbesserung der Herstellungsverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können
15 fermentationstechnische Maßnahmen, wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie z.B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform, durch z.B. Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen,
20 d.h. die genetisch bedingten Leistungseigenschaften des Bakteriums selbst betreffen.

US-A-5,538,873 und EP-B-0593792 oder Okamoto et al. (Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 61 (11), 1877 - 1882, 1997) beschreiben, dass Threonin durch
25 Fermentation im Satzverfahren (batch) oder Zulaufverfahren (fed batch) hergestellt werden kann. Weiterhin ist in US 6,562,601 ein Verfahren zur Herstellung von L-Threonin unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae beschrieben, bei dem nach Durchführung einer Fermentation
30 im Zulaufverfahren (fed batch) die Fermentationsbrühe auf 1-90 Vol.-% abgelassen wird, anschließend die verbleibende Fermentationsbrühe mit Wachstumsmedium auffüllt und bevorzugt nach einer Wachstumsphase eine weitere

Fermentation nach dem genannten Zulaufverfahren (fed batch) durchführt. Dieses Verfahren kann mehrmals wiederholt werden und heißt daher wiederholtes Zulaufverfahren (repeated fed batch).

5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich die Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von L-Threonin bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

10 Gegenstand der Erfindung ist ein Fermentationsverfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man

- a) das Bakterium in mindestens einem ersten Nährmedium inokuliert und kultiviert, anschließend
- b) einen Teil der Fermentationsbrühe abtrennt, wobei mehr
15 als 90 Vol.-%, insbesondere mehr als 92 Vol.-%, mehr als 93 Vol.-%, bevorzugt mehr als 94 Vol.-%, bevorzugt mehr als 95% und besonders bevorzugt mehr als 98 Vol.-% des Gesamtvolumens der Fermentationsbrühe im Fermentationsbehälter verbleiben, anschließend
- 20 c) die verbleibende Fermentationsbrühe mit einem oder mehreren weiteren Nährmedien auffüllt, wobei das weitere Nährmedium oder die weiteren Nährmedien mindestens eine Kohlenstoffquelle, mindestens eine Stickstoffquelle und mindestens eine Phosphorquelle
25 enthalten, und die Kultivierung unter Bedingungen die die Bildung von L-Threonin erlauben, fortsetzt,
- d) die Schritte b) und c) gegebenenfalls mehrfach durchführt,
- e) die Konzentration der Kohlenstoffquelle(n) während der
30 Kultivierung bei maximal 10 g/l eingestellt wird,

f) die Ausbeute des gebildeten L-Threonins bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle mindestens 37 Gew.-% beträgt, und

5 g) L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 2,5 g/l pro Std. gebildet wird.

Erfindungsgemäß kann die Anlagenleistung einer L-Threonin produzierenden Fermentationseinheit dadurch gesteigert werden, dass man in dem oben beschriebenen ersten Kultivierungsschritt (a) nach dem Satzverfahren (batch) 10 oder Zulaufverfahren (fed batch) kultiviert, wobei bei Verwendung des Zulaufverfahrens mindestens ein Zusatz-Nährmedium eingesetzt wird. In dem beschriebenen Kultivierungsschritt (b) wird der Kultur Fermentationsbrühe entzogen, wobei weniger als 10 Vol.-%, insbesondere weniger 15 als 8 Vol.-%, weniger als 7 Vol.-%, bevorzugt weniger als 6 Vol.-%, bevorzugt weniger als 5 Vol.-% und besonders bevorzugt weniger als 2 Vol.-% des Gesamtvolumens der Fermentationsbrühe abgetrennt werden.

Anschließend, im Schritt (c) wird die verbleibende 20 Fermentationsbrühe mit einem oder mehreren weiteren Nährmedien aufgefüllt, wobei das weitere Nährmedium oder die weiteren Nährmedien mindestens eine Kohlenstoffquelle, mindestens eine Stickstoffquelle und mindestens eine Phosphorquelle enthalten, und die Kultivierung unter 25 Bedingungen die die Bildung von L-Threonin erlauben, fortgesetzt wird.

Während des Kultivierungsschrittes (a) wird das Bakterium in mindestens einem ersten Nährmedium inokuliert und nach dem Satzverfahren (batch) oder Zulaufverfahren (fed batch) 30 kultiviert. Bei Verwendung des Zulaufverfahrens wird nach mehr als 0 bis maximal 10 Stunden, vorzugsweise nach 1 bis 10 Stunden, bevorzugt nach 2 bis 10 Stunden und besonders bevorzugt nach 3 bis 7 Stunden ein Zusatz-Nährmedium zugeführt.

Das erste Nährmedium enthält als Kohlenstoffquelle eine oder mehrere der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Saccharose, Melasse aus Zuckerrüben oder Zuckerrohr, Fruktose, Glukose, Stärkehydrolysat, Laktose, Galaktose, Maltose, Xylose, Essigsäure, Ethanol und Methanol in den Konzentrationen von 1 bis 50 g/kg, bevorzugt von 10 bis 45 g/kg, besonders bevorzugt von 20 bis 40 g/kg. Unter Stärkehydrolysat versteht man erfindungsgemäß das Hydrolysat von Stärke aus Mais, Getreide, Kartoffeln oder Tapioka.

Als Stickstoffquelle im erste Nährmedium können organische, Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniak, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat Kaliumnitrat, Kaliumnatriumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung in den Konzentrationen von 1 bis 40 g/kg, bevorzugt von 10 bis 30 g/kg, besonders bevorzugt von 10 bis 25 g/kg verwendet werden.

Als Phosphorquelle im ersten Nährmedium können Phosphorsäure, Alkali- oder Erdalkalisalze der Phosphorsäure, insbesondere Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze, Polymere der Phosphorsäure oder das Hexaphosphorsäureester des Inosits auch Phytinsäure genannt in den Konzentrationen von 0,1 bis 5 g/kg, bevorzugt von 0,3 bis 3 g/kg, besonders bevorzugt von 0,5 bis 1,5 g/kg verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Diese Substanzen liegen in den Konzentrationen von 0,003 bis 3 g/kg vor. Schließlich werden essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren (z.B. Homoserin) und Vitamine (z.B. Thiamin)

zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden.

Das Zusatz-Nährmedium, welches in einem Zulaufverfahren (fed batch) angewandt wird, enthält im allgemeinen lediglich als Kohlenstoffquelle eine oder mehrere der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Saccharose, Melasse aus Zuckerrüben oder Zuckerrohr, Fruktose, Glukose, Stärkehydrolysat, Laktose, Galaktose, Maltose, Xylose, Essigsäure, Ethanol und Methanol in den Konzentrationen von 300 bis 700 g/kg, bevorzugt von 400 bis 650 g/kg, und gegebenenfalls eine anorganische Stickstoffquelle wie z.B. Ammoniak, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat, Ammoniumnitrat, Kaliumnitrat oder Kaliumnatriumnitrat. Alternativ können diese und andere Komponenten auch separat zugefüttert werden.

Es wurde gefunden, dass die Bestandteile des weiteren Nährmediums in Form eines einzigen weiteren Nährmediums sowie in einer Vielzahl von weiteren Nährmedien der Kultur zugeführt werden können. Erfindungsgemäß wird das weitere Nährmedium beziehungsweise werden die weiteren Nährmedien in mindestens einem (1) Zufütterungsstrom oder in einer Vielzahl an Zufütterungsströmen mindestens 2 bis 10, vorzugsweise 2 bis 7 oder 2 bis 5 Zufütterungsströmen der Kultur zugeführt.

Das weitere Nährmedium bzw. die weiteren Nährmedien enthält/enthalten als Kohlenstoffquelle eine oder mehrere der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Saccharose, Melasse aus Zuckerrüben oder Zuckerrohr, Fruktose, Glukose, Stärkehydrolysat, Maltose, Xylose, Essigsäure, Ethanol und Methanol in den Konzentrationen von 20 bis 700 g/kg, bevorzugt von 50 bis 650 g/kg.

Weiterhin enthält das weitere Nährmedium bzw. enthalten die weiteren Nährmedien eine Stickstoffquelle bestehend aus organischen, Stickstoff-haltigen Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, 5 Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniak, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat, Ammoniumnitrat und/oder Kaliumnitrat oder Kaliumnatriumnitrat. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung in den 10 Konzentrationen von 5 bis 50 g/kg, bevorzugt von 10 bis 40 g/kg, verwendet werden.

Weiterhin enthält das weitere Nährmedium bzw. enthalten die weiteren Nährmedien eine Phosphorquelle bestehend aus Phosphorsäure, Alkali- oder Erdalkalisalze der 15 Phosphorsäure, insbesondere Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze, Polymere der Phosphorsäure oder das Hexaphosphorsäureester des Inosits auch Phytinsäure genannt. Die Phosphorquellen können einzeln oder als 20 Mischung in den Konzentrationen von 0,3 bis 3 g/kg, bevorzugt von 0,5 bis 2 g/kg verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind, in den Konzentrationen von 0,003 25 bis 3 g/kg, bevorzugt in den Konzentrationen von 0,008 bis 2 g/kg. Schließlich werden essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren (z.B. Homoserin) und Vitamine (z.B. Thiamin) zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie 30 z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden.

Bei Verwendung eines einzigen weiteren Nährmediums wird dieses typischerweise in einem Zufütterungsstrom der Kultur zugeführt. Bei Verwendung einer Vielzahl weiterer Nährmedien werden diese in einer entsprechenden Vielzahl an 35 Zufütterungsströmen zugeführt. Bei der Verwendung einer

Vielzahl weiterer Nährmedien ist zu beachten, dass diese jeweils nur eine der beschriebenen Kohlenstoff-, Stickstoff-, oder Phosphorquellen enthalten können, aber auch eine Mischung von den beschriebenen Kohlenstoff-,
5 Stickstoff-, oder Phosphorquellen.

Erfindungsgemäß wird das zugeführte Nährmedium oder die zugeführten Nährmedien so eingestellt, das ein Phosphor zu Kohlenstoffverhältnis (P/C Verhältnis) von maximal 4; von maximal 3; von maximal 2; von maximal 1,5; von maximal 1; von maximal 0,7; von maximal 0,5; maximal 0,48; maximal 0,46; maximal 0,44; maximal 0,42; maximal 0,40; maximal 0,38; maximal 0,36; maximal 0,34; maximal 0,32; maximal 0,30 mmol Phosphor / mol Kohlenstoff besteht.

Das in Schritt (b) beschriebene Abtrennen der
15 Fermentationsbrühe geschieht in weniger als 180 Minuten, vorzugsweise in weniger als 120 Minuten, besonders bevorzugt in weniger als 60 Minuten.

Wird ein weiteres oder mehrere weitere Nährmedien wie unter Schritt (c) beschrieben zum Auffüllen genutzt kann dieses
20 Auffüllen schnellstmöglich oder kontinuierlich erfolgen. Erfolgt das Auffüllen schnellstmöglich, geschieht dies erfindungsgemäß in weniger als 180 Minuten, vorzugsweise in weniger als 120 Minuten, besonders bevorzugt in weniger als 60 Minuten, besonders bevorzugt in weniger als 30 Minuten.
25 Anschließend erfolgt die Kultivierung bis zum Verbrauch der Kohlenstoffquelle oder bis zu einem anderen geeigneten Zeitpunkt kurz vor dem vollständigen Verbrauchen der Kohlenstoffquelle, bevor wiederum Fermentationsbrühe gemäß Schritt (b) abgelassen wird. Erfolgt das Auffüllen
30 kontinuierlich, so setzt man das Auffüllen mit einem oder mehreren weiteren Nährmedien fort, bis der Füllstand von annähernd 100% wieder erreicht ist. Anschließend kultiviert man so lange weiter, bis die Kohlenstoffquelle verbraucht ist.

Werden wie unter Schritt (c) beschrieben mehrere weitere Nährmedien zum Auffüllen genutzt, so können sofort alle weitere Nährmedien in den Fermenter gegeben werden (schnellstmögliches Auffüllen) oder ein oder mehrere
5 weitere Nährmedien schnellstmöglich zugegeben werden und anschließend ein oder mehrere weitere Nährmedien kontinuierlich zugeführt werden. Erfolgt das Auffüllen kontinuierlich, so setzt man das Auffüllen mit einem oder mehreren weiteren Nährmedien fort, bis der Füllstand von
10 annähernd 100% wieder erreicht ist. Anschließend kultiviert man so lange weiter, bis die Kohlenstoffquelle verbraucht ist.

Die Kultivierung in den Schritten (a) und (c) erfolgt unter Bedingungen die die Bildung von L-Threonin erlauben.
15 Während der Kultivierung wird die Temperatur in einem Bereich von 27 bis 45°C, vorzugsweise 29 bis 42°C, besonders bevorzugt 33 bis 40°C, eingestellt. Die Fermentation kann bei Normaldruck oder gegebenenfalls bei Überdruck, vorzugsweise bei 0 bis 2,5 bar Überdruck,
20 besonders bevorzugt bei 0 bis 1,5 bar durchgeführt werden. Der Sauerstoffpartialdruck wird auf 5 bis 50%, vorzugsweise ca. 20%, Luftsättigung geregelt. Die Regelung des pH-Wertes auf pH ca. 6 bis 8, vorzugsweise 6,5 bis 7,5 kann mit 25%igem Ammoniakwasser erfolgen. Die Bedingungen der
25 Kultivierung können während der Kultivierung konstant bleiben oder verändert werden. Ebenso können die Kultivierungsbedingungen in Schritt (a) und (c) identisch sein oder sich unterscheiden.

Die Wiederholung der Schritte (b) und (c) gemäß (d) erfolgt
30 0 bis 100 mal, bevorzugt 2 bis 80 mal, bevorzugt 4 bis 50 mal und besonders bevorzugt 5 bis 30 mal.

Die Zeit zwischen Abtrennen der Fermentationsbrühe auf mehr als 90 Vol.-%, insbesondere mehr als 92 Vol.-%, bevorzugt mehr als 93 Vol.-%, mehr als 94 Vol.-%, bevorzugt mehr als
35 95 Vol.-% und besonders bevorzugt mehr als 98 Vol.-% des

Gesamtvolumens und dem vollständigen Auffüllen auf ca. 100% beträgt maximal 5 Stunden, bevorzugt maximal 3 Stunden, besonders bevorzugt maximal 2 Stunden.

Das Ablassen von Fermentationsbrühe und Auffüllen mit
5 Nährmedien erfolgt mit einer Geschwindigkeit die einer mittleren Verweilzeit von kleiner als 50 Stunden, bevorzugt kleiner als 30, ganz besonders bevorzugt kleiner als 20 Stunden ohne Berücksichtigung der Ablasszeiten entspricht. Dabei ist die mittlere Verweilzeit (residence time) die
10 theoretische Zeit, die Teilchen in einer kontinuierlich betriebenen Kultur verbleiben. Die mittlere Verweilzeit wird beschrieben durch das Verhältnis des Flüssigkeitsvolumens des Reaktors und der Durchflussmenge (Biotechnologie; H. Weide, J. Páca und W. A. Knorre; Gustav
15 Fischer Verlag Jena; 1991). Die Füllstandmessung kann direkt z.B. über Radarmessung oder indirekt z.B. über eine Massebestimmung erfolgen.

Erfindungsgemäß wird die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Kultivierung bei maximal 10
20 g/l, bevorzugt bei maximal 5 g/l, besonders bevorzugt maximal 2 g/l eingestellt. Dabei wird die Konzentration der Kohlenstoffquelle anhand von Methoden bestimmt, die Stand der Technik sind. β -D-Glukose wird z.B. in einem Glukoseanalysator YSI 02700 Select der Firma Yello Springs
25 Instruments (Yellow Springs, Ohio, USA) bestimmt.

Gegebenenfalls kann die entnommene Kulturbrühe mit Sauerstoff oder einem sauerstoffhaltigen Gas versehen werden bis die Konzentration der Kohlenstoffquelle unter 2 g/l; unter 1 g/l; oder unter 0,5 g/l sinkt.

30 Erfindungsgemäß beträgt die Ausbeute mindestens 37 Gew.-%; mindestens 40 Gew.-%; mindestens 42 Gew.-%; mindestens 44 Gew.-%; mindestens 46 Gew.-%, mindestens 48 Gew.-% betragen. Dabei ist die Ausbeute definiert als das Verhältnis von der in einer Kultivierung gesamt gebildeten

Menge an L-Threonin zu der Gesamtmenge der eingesetzten oder verbrauchten Kohlenstoffquelle.

Erfindungsgemäß wird L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 2,5 bis 3,5 g/l pro Std., von
5 mindestens 2,5 bis mehr als 3,5 g/l pro Std., von mindestens 3,5 bis 5,0 g/l pro Std., von mindestens 3,5 bis mehr als 5,0 g/l pro Std., oder von mindestens 5,0 bis 8,0 g/l oder mehr pro Std. gebildet. Dabei ist die Raum-Zeit-Ausbeute definiert als das Verhältnis von der in einer
10 Kultivierung gesamt gebildeten Threoninmenge zu dem aktiv produzierenden Volumen der Kultur über den gesamten Zeitraum der Kultivierung gesehen. Die Raum-Zeit-Ausbeute wird auch volumetrische Produktivität genannt.

Die Mikroorganismen, mit denen das erfindungsgemäße
15 Verfahren durchgeführt werden kann, können L-Threonin aus kohlenstoffhaltigen Substraten herstellen, wobei die Herstellung aus Glucose, Stärkehydrolysat, Saccharose oder Melasse bevorzugt wird. Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind L-Threonin produzierende
20 Bakterien der Familie Enterobacteriaceae, ausgewählt aus den Gattungen Escherichia, Erwinia, Providencia und Serratia geeignet. Die Gattungen Escherichia und Serratia werden bevorzugt. Bei der Gattung Escherichia ist insbesondere die Art Escherichia coli und bei der Gattung
25 Serratia insbesondere die Art Serratia marcescens zu nennen.

Geeignete L-Threonin produzierende Stämme der Gattung Escherichia, insbesondere der Art Escherichia coli sind beispielsweise

30 Escherichia coli TF427
 Escherichia coli H4578
 Escherichia coli KY10935
 Escherichia coli EL1003
 Escherichia coli VNIIGenetika MG-442

- Escherichia coli VNIIGenetika VL334/pYN7
- Escherichia coli VNIIGenetika M1
- Escherichia coli VNIIGenetika 472T23
- Escherichia coli VNIIGenetika TDH-6
- 5 Escherichia coli BKIIM B-3996
- Escherichia coli BKIIM B-5318
- Escherichia coli B-3996-C43
- Escherichia coli B-3996-C80
- Escherichia coli B-3996/pTWV-pps
- 10 Escherichia coli B-3996 (pMW::THY)
- Escherichia coli B-3996/pBP5
- Escherichia coli kat 13
- Escherichia coli KCCM-10132

- Geeignete L-Threonin produzierende Stämme der Gattung
- 15 Serratia, insbesondere der Art Serratia marcescens sind beispielsweise

Serratia marcescens HNr21
 Serratia marcescens TLr156
 Serratia marcescens T2000

- 20 Die Bakterien enthalten mindestens eine Kopie eines thrA-Gens oder Allels, das für eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I kodiert. Derartige Bakterien sind typischerweise resistent gegen das Threoninanalogon α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure (AHV).
- 25 L-Threonin produzierende Stämme aus der Familie der Enterobacteriaceae besitzen bevorzugt, unter anderen, ein oder mehrere der genetischen bzw. phänotypischen Merkmale ausgewählt aus der Gruppe: Resistenz gegen α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure, Resistenz gegen Thialysin, Resistenz
- 30 gegen Ethionin, Resistenz gegen α -Methylserin, Resistenz gegen Diaminobernsteinsäure, Resistenz gegen α -Aminobuttersäure, Resistenz gegen Borrelidin, Resistenz gegen Rifampicin, Resistenz gegen Valin-Analoga wie beispielsweise Valinhydroxamat, Resistenz gegen

- Purinanaloga wie beispielsweise 6-Dimethylaminopurin, Bedürftigkeit für L-Methionin, gegebenenfalls partielle und kompensierbare Bedürftigkeit für L-Isoleucin, Bedürftigkeit für meso-Diaminopimelinsäure, Auxotrophie bezüglich
- 5 Threonin-haltiger Dipeptide, Resistenz gegen L-Threonin, Resistenz gegen L-Homoserin, Resistenz gegen L-Lysin, Resistenz gegen L-Methionin, Resistenz gegen L-Glutaminsäure, Resistenz gegen L-Aspartat, Resistenz gegen L-Leucin, Resistenz gegen L-Phenylalanin, Resistenz gegen
- 10 L-Serin, Resistenz gegen L-Cystein, Resistenz gegen L-Valin, Empfindlichkeit gegenüber Fluoropyruvat, defekte Threonin-Dehydrogenase, gegebenenfalls Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung, Verstärkung des Threonin-Operons, Verstärkung der Homoserin-Dehydrogenase I-Aspartatkinase I
- 15 bevorzugt der feed back resistenten Form, Verstärkung der Homoserinkinase, Verstärkung der Threoninsynthase, Verstärkung der Aspartatkinase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-
- 20 Carboxylase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-Synthase, Verstärkung der Transhydrogenase, Verstärkung des RhtB-Genproduktes, Verstärkung des RhtC-Genproduktes, Verstärkung des YfiK-Genproduktes, Verstärkung einer Pyruvat-Carboxylase, und
- 5 Abschwächung der Essigsäurebildung.

- So besitzt beispielsweise der Stamm 472T23 eine verstärkte, „feed back“ resistente Aspartatkinase I-Homoserindehydrogenase I, eine abgeschwächte Threonin-Desaminase, eine Resistenz gegen 5 g/l L-Threonin und die
- 30 Fähigkeit Saccharose als Kohlenstoffquelle zu verwerten.

- Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise
- 35 die Kopienzahl des Gens oder Allels bzw. der Gene oder

Allele erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

- 5 Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise
- 10 einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.
- 15 Darüber hinaus sind Bakterien der Familie Enterobacteriaceae geeignet, die ein Stopkodon ausgewählt aus der Gruppe opal, ochre und amber, bevorzugt amber im rpoS-Gen und einen t-RNA-Suppressor ausgewählt aus der Gruppe opal-Suppressor, ochre-Suppressor und amber-
- 20 Suppressor, bevorzugt amber-Suppressor enthalten. Die amber-Mutation liegt vorzugsweise an der Position 33 entsprechend der Aminosäuresequenz des RpoS-Genproduktes. Als amber-Suppressor wird vorzugsweise supE eingesetzt. Diese Bakterien sind in PCT/EP02/02055 beschrieben.
- 25 Die Nukleotidsequenz des rpoS-Gens kann dem Stand der Technik entnommen werden. Die Nukleotidsequenz des rpoS-Gens entsprechend der Accession No. AE000358 ist als SEQ ID NO. 1 dargestellt. Die Aminosäuresequenz des dazugehörigen RpoS-Genproduktes bzw. Proteins ist in der SEQ ID NO. 2
- 30 dargestellt. Die Nukleotidsequenz eines rpoS-Allels, das ein Stopkodon vom Typ amber an der Stelle der Nukleotidsequenz entsprechend Position 33 der Aminosäuresequenz des RpoS-Genproduktes bzw. Proteins, entsprechend SEQ ID NO. 1 bzw. SEQ ID NO. 2, enthält, ist
- 35 in SEQ ID NO. 3 wiedergegeben. Der Suppressor supE ist

ebenfalls im Stand der Technik beschrieben und als SEQ ID NO. 4 dargestellt.

Für das beschriebene Verfahren sind entsprechend stabile Stämme, die ihre Produktionseigenschaften im Laufe des
5 Verfahrens nicht verlieren, besonders geeignet.

Es ist ebenfalls möglich aus der entnommenen Kulturbrühe (=Fermentationsbrühe) ein Produkt herzustellen, indem man die in der Kulturbrühe enthaltene Biomasse des Bakteriums vollständig (100%) oder nahezu vollständig d.h. mehr als
10 oder größer als (>) 90%, >95%, >97%, >99% entfernt und die übrigen Bestandteile der Fermentationsbrühe weitgehend d.h. zu 30% - 100%, 40% - 100%, 50% - 100%, 60% - 100%, 70% - 100%, 80% - 100%, oder 90% - 100%, bevorzugt größer gleich (>=) 50%, >=60%, >=70%, >=80%, >=90% oder >=95% oder auch
15 vollständig (100%) im Produkt belässt.

Zur Entfernung oder Abtrennung der Biomasse werden Separationsmethoden wie beispielsweise Zentrifugation, Filtration, Dekantieren, Flockung oder eine Kombination hieraus eingesetzt.

20 Die erhaltene Brühe wird anschließend mit bekannten Methoden wie beispielsweise mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, durch Nanofiltration oder einer Kombination hieraus eingedickt
25 beziehungsweise konzentriert.

Diese aufkonzentrierte Brühe wird anschließend durch Methoden der Gefriertrocknung, der Sprühtrocknung, der Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren zu einem vorzugsweise rieselfähigen, feinteiligen Pulver
30 aufgearbeitet. Dieses rieselfähige, feinteilige Pulver kann dann wiederum durch geeignete Kompaktier- oder Granulier-Verfahren in ein grobkörniges, gut rieselfähiges, lagerbares und weitgehend staubfreies Produkt überführt

werden. Das Wasser wird hierbei insgesamt zu mehr als 90% entfernt, sodass der Wassergehalt im Produkt kleiner als 10%, kleiner als 5% beträgt.

Die angegebenen Verfahrensschritte müssen nicht
5 notwendigerweise in der hier aufgeführten Reihenfolge durchgeführt sondern können gegebenenfalls in technisch sinnvoller Weise kombiniert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich gegenüber dem üblichen fed batch-Verfahren, vor allem durch eine erhöhte
10 Raum-Zeit-Ausbeute aus.

Die Analyse von L-Threonin und anderen Aminosäuren kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958))
15 beschrieben, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)) beschrieben.

Patentansprüche

1. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Threonin unter Verwendung von L-Threonin produzierenden Bakterien der Familie Enterobacteriaceae, dadurch gekennzeichnet, dass man
- 5
- a) das Bakterium in mindestens einem ersten Nährmedium inokuliert und kultiviert,
- b) einen Teil der Fermentationsbrühe abtrennt, wobei mehr als 90 Vol.-% des Gesamtvolumens der Fermentationsbrühe im Fermentationsbehälter verbleiben, anschließend
- 10
- c) die verbleibende Fermentationsbrühe mit einem oder mehreren Nährmedien auffüllt, wobei das weitere Nährmedium oder die weiteren Nährmedien mindestens eine Kohlenstoffquelle, mindestens eine Stickstoffquelle und mindestens eine Phosphorquelle enthalten, und die Kultivierung unter Bedingungen die die Bildung von L-Threonin erlauben, fortsetzt,
- 15
- d) die Schritte b) und c) gegebenenfalls mehrfach durchführt,
- 20
- e) die Konzentration der Kohlenstoffquelle(n) während der Kultivierung bei maximal 10 g/l eingestellt wird,
- 25
- f) die Ausbeute des gebildeten L-Threonins bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle mindestens 37 Gew.-% beträgt, und
- g) L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 2,5 g/l pro Std. gebildet wird.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Kultivierungsschritt (a) nach dem Satzverfahren (batch) durchgeführt wird.
- 5 3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Kultivierungsschritt (a) nach dem Zulaufverfahren (fed batch) durchgeführt wird, wobei mindestens ein Zusatz-Nährmedium eingesetzt wird.
- 10 4. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Fermentationsbrühe zu weniger als 8 Vol.-% abgetrennt wird.
- 5 5. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Fermentationsbrühe zu weniger als 5 Vol.-% abgetrennt wird.
- 15 6. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Fermentationsbrühe zu weniger als 2 Vol.-% abgetrennt wird.
7. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass das gebildete L-Threonin gereinigt wird.
- 20 8. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Kohlenstoffquelle um eine oder mehrere der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Saccharose, Melasse aus Zuckerrüben oder Zuckerrohr, Fruktose, Glukose, Stärkehydrolysat, Maltose, Xylose, 25 Essigsäure, Ethanol und Methanol handelt.
- 30 9. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Stickstoffquelle um eine oder mehrere organische, Stickstoff-haltige Stoffe oder Stoffgemische ausgewählt aus der Gruppe Peptone, Hefeextrakte, Fleischextrakte, Malzextrakte, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff und/oder um eine oder mehrere der anorganischen Verbindungen

ausgewählt aus der Gruppe Ammoniak, Ammonium-haltige Salze und Salze der Salpetersäure handelt.

- 5 10. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei Ammonium-haltigen Salzen und Salzen der Salpetersäure um Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat, Ammoniumnitrat, Kaliumnitrat und Kaliumnatriumnitrat handelt.
- 10 11. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Phosphorquelle um Alkali- oder Erdalkalisalze der Phosphorsäure oder deren Polymere oder der Phytinsäure handelt.
- 15 12. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Alkalisalzen der Phosphorsäure um Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze handelt.
- 20 13. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Bakterien der Familie Enterobacteriaceae um die Art Escherichia coli handelt.
- 25 14. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Bakterium der Familie Enterobacteriaceae mindestens ein thrA-Gen oder Allel enthält, das für eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I kodiert.
- 30 15. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Bakterium der Familie Enterobacteriaceae ein Stopkodon ausgewählt aus der Gruppe opal, ochre und amber, bevorzugt amber im rpoS-Gen und einen t-RNA-Suppressor ausgewählt aus der Gruppe opal-Suppressor, ochre-Suppressor und amber-Suppressor, bevorzugt amber-Suppressor enthält.

16. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Schritte (b) und (c) gemäß (d) 0 bis 100 mal, bevorzugt 2 bis 80 mal, bevorzugt 4 bis 50 mal und besonders bevorzugt 5 bis 30 mal wiederholt werden.
- 5 17. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zeit zwischen vollständigen Abtrennen der Fermentationsbrühe auf mehr als 90 Vol.-% des Gesamtvolumens und dem vollständigen Auffüllen von Nährmedien auf ca. 100% maximal 5 Stunden, beträgt.
- 10 18. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass das vollständige Auffüllen von Nährmedien maximal 2 Stunden beträgt.
- 15 19. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in dem zugeführtem Nährmedium oder den zugeführten Nährmedien ein Phosphor zu Kohlenstoffverhältnis (P/C Verhältnis) von maximal 4; von maximal 3; von maximal 2; von maximal 1,5; von maximal 1; von maximal 0,7; von maximal 0,5; maximal 0,48; maximal 0,46; maximal 0,44; maximal 0,42; maximal 0,40; maximal 0,38; maximal 0,36; maximal 0,34; maximal 0,32; maximal 0,30 eingestellt wird.
- 20 20. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die entnommene Kulturbrühe mit Sauerstoff oder einem sauerstoffhaltigen Gas versehen wird bis die Konzentration der Kohlenstoffquelle unter 2 g/l; unter 1 g/l; unter 0,5 g/l sinkt.
- 25 21. Verfahren gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass das gebildete L-Threonin gereinigt wird.
- 30 22. Verfahren gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass man zunächst die Biomasse aus der entnommenen Kultur in Schritt (b) zu mindestens 90% entfernt und anschließend das Wasser zu mindestens 90% entfernt.

23. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Kultur bei maximal 5 g/l eingestellt wird.
- 5 24. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Kultur bei maximal 2 g/l eingestellt wird.
- 10 25. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausbeute des gebildeten L-Threonins, bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle, mindestens 48 Gew.-% beträgt.
- 15 26. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausbeute des gebildeten L-Threonins, bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle, mindestens 44 Gew.-% beträgt.
- 20 27. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausbeute des gebildeten L-Threonins, bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle, mindestens 40 Gew.-% beträgt.
- 25 28. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 5,0 bis mehr als 8,0 g/l pro Std. gebildet wird.
- 25 29. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 3,5 bis mehr als 5,0 g/l pro Std. gebildet wird.
- 30 30. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 2,5 bis mehr als 3,5 g/l pro Std. gebildet wird.

- 5 31. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein Zulaufverfahren im Kultivierungsschritt (a) angewandt wird, und dass L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 2,5 bis 5,0 g/l pro Std. gebildet wird.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Threonin unter Verwendung von L-Threonin produzierenden Bakterien der Familie
5 Enterobacteriaceae.

SEQUENZPROTOKOLL:

5 <110> Degussa AG

<120> Verfahren zur Herstellung von L-Threonin

10 <130> 030235-BT

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

15 <210> 1

<211> 993

<212> DNA

<213> Escherichia coli

20 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(990)

<223>

25 <400> 1

atg agt cag aat acg ctg aaa gtt cat gat tta aat gaa gat gcg gaa	48
Met Ser Gln Asn Thr Leu Lys Val His Asp Leu Asn Glu Asp Ala Glu	
1 5 10 15	
30 ttt gat gag aac gga gtt gag gtt ttt gac gaa aag gcc tta gta gaa	96
Phe Asp Glu Asn Gly Val Glu Val Phe Asp Glu Lys Ala Leu Val Glu	
20 25 30	
35 cag gaa ccc agt gat aac gat ttg gcc gaa gag gaa ctg tta tcg cag	144
Gln Glu Pro Ser Asp Asn Asp Leu Ala Glu Glu Glu Leu Leu Ser Gln	
35 40 45	
40 gga gcc aca cag cgt gtg ttg gac gcg act cag ctt tac ctt ggt gag	192
Gly Ala Thr Gln Arg Val Leu Asp Ala Thr Gln Leu Tyr Leu Gly Glu	
50 55 60	
45 att ggt tat tca cca ctg tta acg gcc gaa gaa gaa gtt tat ttt gcg	240
Ile Gly Tyr Ser Pro Leu Leu Thr Ala Glu Glu Glu Val Tyr Phe Ala	
65 70 75 80	
cg t cgc gca ctg cgt gga gat gtc gcc tct cgc cgc cgg atg atc gag	288
Arg Arg Ala Leu Arg Gly Asp Val Ala Ser Arg Arg Arg Met Ile Glu	
85 90 95	
50 agt aac ttg cgt ctg gtg gta aaa att gcc cgc cgt tat ggc aat cgt	336
Ser Asn Leu Arg Leu Val Val Lys Ile Ala Arg Arg Tyr Gly Asn Arg	
100 105 110	
55 ggt ctg gcg ttg ctg gac ctt atc gaa gag ggc aac ctg ggg ctg atc	384
Gly Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ile Glu Glu Gly Asn Leu Gly Leu Ile	
115 120 125	
60 cgc gcg gta gag aag ttt gac ccg gaa cgt ggt ttc cgc ttc tca aca	432
Arg Ala Val Glu Lys Phe Asp Pro Glu Arg Gly Phe Arg Phe Ser Thr	
130 135 140	
65 tac gca acc tgg tgg att cgc cag acg att gaa cgg gcg att atg aac	480
Tyr Ala Thr Trp Trp Ile Arg Gln Thr Ile Glu Arg Ala Ile Met Asn	
145 150 155 160	

	caa acc cgt act att cgt ttg ccg att cac atc gta aag gag ctg aac	528
	Gln Thr Arg Thr Ile Arg Leu Pro Ile His Ile Val Lys Glu Leu Asn	
	165 170 175	
5	gtt tac ctg cga acc gca cgt gag ttg tcc cat aag ctg gac cat gaa	576
	Val Tyr Leu Arg Thr Ala Arg Glu Leu Ser His Lys Leu Asp His Glu	
	180 185 190	
10	cca agt gcg gaa gag atc gca gag caa ctg gat aag cca gtt gat gac	624
	Pro Ser Ala Glu Glu Ile Ala Glu Gln Leu Asp Lys Pro Val Asp Asp	
	195 200 205	
15	gtc agc cgt atg ctt cgt ctt aac gag cgc att acc tcg gta gac acc	672
	Val Ser Arg Met Leu Arg Leu Asn Glu Arg Ile Thr Ser Val Asp Thr	
	210 215 220	
20	ccg ctg ggt ggt gat tcc gaa aaa gcg ttg ctg gac atc ctg gcc gat	720
	Pro Leu Gly Gly Asp Ser Glu Lys Ala Leu Leu Asp Ile Leu Ala Asp	
	225 230 235 240	
	gaa aaa gag aac ggt ccg gaa gat acc acg caa gat gac gat atg aag	768
	Glu Lys Glu Asn Gly Pro Glu Asp Thr Thr Gln Asp Asp Asp Met Lys	
	245 250 255	
25	cag agc atc gtc aaa tgg ctg ttc gag ctg aac gcc aaa cag cgt gaa	816
	Gln Ser Ile Val Lys Trp Leu Phe Glu Leu Asn Ala Lys Gln Arg Glu	
	260 265 270	
30	gtg ctg gca cgt cga ttc ggt ttg ctg ggg tac gaa gcg gca aca ctg	864
	Val Leu Ala Arg Arg Phe Gly Leu Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Thr Leu	
	275 280 285	
35	gaa gat gta ggt cgt gaa att ggc ctc acc cgt gaa cgt gtt cgc cag	912
	Glu Asp Val Gly Arg Glu Ile Gly Leu Thr Arg Glu Arg Val Arg Gln	
	290 295 300	
40	att cag gtt gaa ggc ctg cgc cgt ttg cgc gaa atc ctg caa acg cag	960
	Ile Gln Val Glu Gly Leu Arg Arg Leu Arg Glu Ile Leu Gln Thr Gln	
	305 310 315 320	
	ggg ctg aat atc gaa gcg ctg ttc cgc gag taa	993
	Gly Leu Asn Ile Glu Ala Leu Phe Arg Glu	
	325 330	
45	<210> 2	
	<211> 330	
	<212> PRT	
	<213> Escherichia coli	
50	<400> 2	
	Met Ser Gln Asn Thr Leu Lys Val His Asp Leu Asn Glu Asp Ala Glu	
	1 5 10 15	
55	Phe Asp Glu Asn Gly Val Glu Val Phe Asp Glu Lys Ala Leu Val Glu	
	20 25 30	
	Gln Glu Pro Ser Asp Asn Asp Leu Ala Glu Glu Glu Leu Leu Ser Gln	
	35 40 45	
60	Gly Ala Thr Gln Arg Val Leu Asp Ala Thr Gln Leu Tyr Leu Gly Glu	
	50 55 60	
65	Ile Gly Tyr Ser Pro Leu Leu Thr Ala Glu Glu Glu Val Tyr Phe Ala	
	65 70 75 80	

Arg Arg Ala Leu Arg Gly Asp Val Ala Ser Arg Arg Arg Met Ile Glu
 85 90 95
 5 Ser Asn Leu Arg Leu Val Val Lys Ile Ala Arg Arg Tyr Gly Asn Arg
 100 105 110
 Gly Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ile Glu Glu Gly Asn Leu Gly Leu Ile
 115 120 125
 10 Arg Ala Val Glu Lys Phe Asp Pro Glu Arg Gly Phe Arg Phe Ser Thr
 130 135 140
 Tyr Ala Thr Trp Trp Ile Arg Gln Thr Ile Glu Arg Ala Ile Met Asn
 145 150 155 160
 15 Gln Thr Arg Thr Ile Arg Leu Pro Ile His Ile Val Lys Glu Leu Asn
 165 170 175
 Val Tyr Leu Arg Thr Ala Arg Glu Leu Ser His Lys Leu Asp His Glu
 180 185 190
 Pro Ser Ala Glu Glu Ile Ala Glu Gln Leu Asp Lys Pro Val Asp Asp
 195 200 205
 25 Val Ser Arg Met Leu Arg Leu Asn Glu Arg Ile Thr Ser Val Asp Thr
 210 215 220
 Pro Leu Gly Gly Asp Ser Glu Lys Ala Leu Leu Asp Ile Leu Ala Asp
 225 230 235 240
 30 Glu Lys Glu Asn Gly Pro Glu Asp Thr Thr Gln Asp Asp Asp Met Lys
 245 250 255
 Gln Ser Ile Val Lys Trp Leu Phe Glu Leu Asn Ala Lys Gln Arg Glu
 260 265 270
 Val Leu Ala Arg Arg Phe Gly Leu Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Thr Leu
 275 280 285
 40 Glu Asp Val Gly Arg Glu Ile Gly Leu Thr Arg Glu Arg Val Arg Gln
 290 295 300
 Ile Gln Val Glu Gly Leu Arg Arg Leu Arg Glu Ile Leu Gln Thr Gln
 305 310 315 320
 5 Gly Leu Asn Ile Glu Ala Leu Phe Arg Glu
 325 330
 50 <210> 3
 <211> 993
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli
 55 <220>
 <221> Allel
 <222> (1)..(990)
 <223> rpoS-Allel
 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (97)..(99)
 <223> amber-Kodon
 65 <400> 3
 atgagtcaga atacgctgaa agttcatgat ttaaatagaag atgcggaatt tgatgagaac

ggagttgagg tttttgacga aaaggcctta gtagaatagg aaccagtgta taacgatttg 120
 gccgaagagg aactgttatc gcagggagcc acacagcgtg tggtggacgc gactcagctt 180
 5 taccttggtg agattgggta ttcaccactg ttaacggccg aagaagaagt ttattttgcg 240
 cgtcgcgcac tgcgtggaga tgcgcctct cgcgcggga tgatcgagag taacttgctg 300
 10 ctggtggtaa aaattgcccg ccgttatggc aatcgtggtc tggcgttgct ggaccttacc 360
 gaagagggca acctggggct gatccgcgcg gtagagaagt ttgaccggga acgtggtttc 420
 cgcttctcaa catacgcaac ctggtggatt cgccagacga ttgaacgggc gattatgaac 480
 15 caaaccgta ctattcgttt gccgattcac atcgtaaagg agctgaacgt ttacctgcga 540
 accgcacgtg agttgtcca taagctggac catgaaccaa gtgcggaaga gatcgagag 600
 20 caactggata agccagttga tgacgtcagc cgtatgcttc gtcttaacga gcgcattacc 660
 tcggtagaca ccccgctggg tgggtgattcc gaaaaagcgt tgctggacat cctggccgat 720
 gaaaaagaga acggtccgga agataccacg caagatgacg atatgaagca gagcatcgtc 780
 25 aaatggctgt tcgagctgaa cgccaaacag cgtgaagtgc tggcacgtcg attcggtttg 840
 ctggggtacg aagcggcaac actggaagat gtaggtcgtg aaattggcct caccctgaa 900
 30 cgtgttcgcc agattcaggt tgaaggcctg cgcggtttgc gcgaaatcct gcaaacgcag 960
 gggctgaata tcgaagcgtt gttccgcgag taa 993
 35 <210> 4
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli
 40 <220>
 <221> tRNA
 <222> (1)..(75)
 <223> supE-Allel
 45 <400> 4
 tggggtatcg ccaagcggta aggcaccgga ttctaattcc ggcattccga ggttcgaatc 60
 ctcgtacccc agcca 75

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.